



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N° :/SNV/2025

Mémoire

Présenté par :

BENHABYLES Nada

MELAB Hadil

SOUALILI Amilia

Pour l'obtention de diplôme de

MASTER

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème : Amylase alcaline de *Bacillus* issus des sols arides : potentiel enzymatique de *Bacillus thuringiensis* B16 et application dans la détergence et l'agroalimentaire.

Soutenu publiquement le 28/06/2025

Devant les jurys

Mme CHERIF-SILINI Hafsa

Mr SILINI Allaoua

Mlle SAADAOUI Nora

Mr NANCIB Nabil

Pr. UFA Sétif 1

Pr. UFA Sétif 1

Dr. UFA Sétif 1

Pr. UFA Sétif 1

Présidente

Promoteur

Co- promotrice

Examineur

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

2024/2025

Remerciements

Nous adressons nos sincères remerciements aux membres de l'Equipe d'Ecologie microbienne, Laboratoire de Microbiologie Appliquée de Sétif- Université Sétif 1- Ferhat Abbas pour avoir mis à notre disposition les moyens matériels et techniques nécessaires à la réalisation de ce travail. Nous exprimons également notre gratitude pour leur accueil, leur collaboration, leur disponibilité et l'ambiance conviviale et professionnelle qu'ils ont su instaurer tout au long de notre présence. Leur soutien et leur esprit d'entraide ont grandement contribué à la réussite de cette recherche.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude, même si aucun mot ne saurait traduire pleinement notre reconnaissance, à :

Pr. Silini Allaoua,

Notre directeur de recherche, pour sa disponibilité constante, sa confiance, son attitude bienveillante et paternelle, sa gentillesse, ainsi que pour sa générosité tant scientifique qu'humaine.

Pr. Silini Hafsa Cherif,

Qui nous a fait l'honneur de présider le jury. Nous la remercions sincèrement pour son accompagnement, sa tendresse inestimable et ses conseils scientifiques éclairés et constructifs.

Dr Saadaoui Nora,

Pour son soutien moral, ses précieux conseils, son aide indéfectible et son affection.

Pr. Nancib Nabil,

Pour avoir accepté d'évaluer notre travail en tant que membre du jury et pour l'attention portée à notre recherche.

Sans vous, ce travail n'aurait jamais pu être mené à bien.

Dédicace

À mes parents bien-aimés,

Faycel et Fadhila,

À vous, qui m'avez guidé avec amour et soutenu en silence,

Ce travail est le fruit de vos prières, de votre patience et de vos sacrifices.

Puisse Allah vous préserver et vous récompenser.

À mes frères **Moncif, Yacine, Omar,**

Et à la mémoire de Madame **Madame BOUZID F., Ép. BENHABYLES,**

Mon enseignante de primaire,

Qui a su semer en moi, dès le début, le goût de l'apprentissage.

Qu'Allah lui accorde Sa miséricorde et le repos éternel.

À **Sofia,** mon âme sœur d'amitié,

Pour son soutien, sa loyauté et sa présence irremplaçable.

À mes binômes **Amilia, Hadil**

Pour les efforts partagés, les discussions constructives et les bons moments vécus ensemble durant cette belle aventure universitaire.

À ma famille élargie **BENHABYLES et BENZAROOUR,**

Et à tous mes enseignants, mes amis.

Merci pour votre affection, vos encouragements, et votre présence à chaque étape
de ce chemin.

Nada

Dédicace

Je dédie ce travail, en premier lieu et tout particulièrement, aux deux personnes les plus importantes et les plus précieuses de ma vie :

Mes parents,

Nasser-Eddine et Lynda

Aucun mot ni aucune expression ne saurait décrire l'immensité de ma reconnaissance et de mon amour pour vous. Merci pour votre attention constante, votre affection, votre tendresse infinie, et pour votre soutien indéfectible. Je vous aime profondément.

À mes frères,

Nazim et Ridha

Merci de m'avoir encouragée à persévérer et à croire en moi tout au long de ce parcours.

À mon cher oncle,

Pr. SOUALILI Zineddine

Qui nous a quitté récemment. Je te remercie du fond du cœur pour l'amour paternel que tu m'as offert, pour ton encouragement permanent, et pour l'esprit curieux et inspirant que tu partageais avec moi. Tu restes à jamais gravé dans ma mémoire.

Que Dieu t'accorde Sa miséricorde et t'accueille dans Ses vastes paradis.

À mes chères amies,

Que je considère comme des sœurs, je vous aime toutes profondément.

Hadil, Nada, Aya Salaouda, Rahil, Amal, Aya, Hanine, Zaineb, Dahibia, Imene.

Merci pour votre présence, votre amitié sincère, vos encouragements et tous les moments partagés.

Vous avez embelli ce parcours, et je vous en suis infiniment reconnaissante.

Amília

Dedication

All praise is due to Allah, first and foremost, outwardly and inwardly for it is by His mercy and guidance that this academic journey has reached its completion. I thank Allah for granting me strength, patience, and clarity throughout every step of the way.

To my beloved parents, Rachid and Fadhila

thank you from the depths of my heart for your endless love, prayers, and sacrifices. You have been my greatest source of strength and inspiration.

To my dear brothers: Younes, Nassim, Mouatez, and Ghaith

your support and encouragement have always lifted me, even in the most challenging times.

To my cherished sisters

Takoua, Asma, and Sara your love and presence have brought comfort and motivation throughout this journey.

And to my wonderful friends

Amilia, Nada, Amel, Rahil, Aya, Hanin, Zayneb, Dhahbia, and Imen thank you for your constant encouragement, your kind words, and your faith in me when I needed it most.

To everyone who believed in me and walked beside me in this journey this work is a reflection of your support and, above all, the grace of Allah.

Hadil

Table de matières

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction	1
1. Revue bibliographique	3
1.1. Intérêt industriel des enzymes	3
1.2. Les amylases	4
1.2.1. Définition	4
1.2.2. Le marché des amylases	4
1.2.3. Les sources d'amylase	5
1.2.4. Classification des amylases	8
1.2.5. Méthodes de caractérisation de la production et de l'activité de l'amylase	12
1.2.6. Production de l'amylase alcaline	13
1.2.7. Amylase alcaline	15
1.2.8. Purification de l'amylase	18
1.3. Application d'amylase	20
1.3.1. Utilisation des amylases dans l'industrie des détergents	20
1.3.2. Industrie textile	21
1.3.3. Le domaine de la production de biocarburants	22
1.3.4. Amylase dans l'industrie pharmaceutique	22
1.3.5. Amylase dans la boulangerie	23
1.4. <i>Bacillus</i>	24
1.4.1. Classification	25

1.4.2.	Caractéristiques phénotypiques des <i>Bacillus</i>	25
1.4.3.	Taxonomie	26
2.	Matériels et méthodes	28
2.1.	Obtention des souches de <i>Bacillus</i>	28
2.2.	Purification des souches de références	30
2.2.1.	Criblage des souches bactériennes productrices de l'amylase alcaline	30
2.3.	Production de l'amylase sur milieu liquide.....	31
2.4.	Évaluation de l'activité amylasique	31
2.5.	Effet des stress abiotiques sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.....	32
2.5.1.	Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme	32
2.5.2.	Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.....	32
2.5.3.	Évaluation de l'effet des inhibiteurs sur la stabilité enzymatique	33
2.5.4.	Étude de l'effet des ions métalliques sur la stabilité enzymatique	33
2.6.	Application	33
2.6.1.	Agent détergent	33
2.6.2.	Agent clarifiant de jus	34
2.6.3.	Agent améliorant du pain	34
2.6.4.	Analyse statistique.....	35
3.	Résultats et Discussion	36
3.1.	Résultats	36
3.1.1.	Criblage des souches productrices de l'amylase alcaline.....	36
3.1.2.	Evaluation de l'activité de l'amylase alcaline	39
3.1.3.	Effet des paramètres physicochimiques sur l'activité et la stabilité amylasique 40	
3.1.4.	Applications de l'amylase alcaline	47
3.2.	Discussion	51
4.	Conclusion	57

Références Bibliographiques59

Annexes67

الملخص

يندرج هذا العمل ضمن إطار تثمين القدرات البيوتكنولوجية لسلاسلات *Bacillus* المعزولة من ترب جزائرية مختلفة، بهدف إنتاج أميلاز قلوي يتميز بثبات عالٍ في ظل ظروف فيزيائية وكيميائية قاسية. تم فحص 39 سلالة في وسط يحتوي على النشاء عند درجة حموضة 10، حيث أظهرت ست سلالات (B16, B21, Ba9, Ba7, D7, D13) أعلى مؤشرات النشاط الإنزيمي. في حين أظهرت التحاليل الكمية في الوسط السائل أن النشاط تراوح بين 48 و 167، مع ثبات ملحوظ، خصوصاً لدى السلالات B21 و B16 و D13. تم تقييم ثبات الأميلاز تحت تأثير ضغوط مختلفة، مثل درجات الحرارة (من 30 إلى 80 °C)، والتغيرات في درجة الحموضة (من 6 إلى 12)، ووجود عوامل كيميائية مثل H_2O_2 و SDS و NaCl و EDTA. كشفت التحاليل المتعددة المتغيرات أن السلالة B16 كانت الأكثر مقاومة، محافظةً على أكثر من 90% من نشاطها في معظم الظروف. كما أظهرت إضافة أيونات معدنية مثل Co^{2+} و Zn^{2+} و Ca^{2+} تحفيزاً كبيراً للنشاط عند درجة الحموضة 10، حيث وصل إلى 72 U/mL مع الكوبالت. أظهر المستخلص الإنزيمي للسلالة B16 خصائص تطبيقية واعدة مثل فعالية تنظيفية ضد البقع النشوية، وتوضيح العصائر، وتحسين الخصائص الحسية للخبز. تؤكد هذه النتائج الإمكانيات الصناعية الكبيرة للأميلازات القلوية المنتجة، خاصة في مجالات المنظفات، والصناعات الغذائية، ومعالجة النفايات الغنية بالنشاء.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus* ، أميلاز قلوي، الثبات الإنزيمي، درجة الحموضة 10 ، أيونات معدنية، منظفات.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des souches du genre *Bacillus* isolées de différents sols algériens, dans le but de produire des amylases alcalines stables aux contraintes physicochimiques. Trente-neuf souches (n 39) ont été criblées sur gélose à l'amidon à pH 10, dont six (B16, B21, D13, D7, Ba7, Ba9) ont présenté les indices enzymatiques les plus élevés. La quantification de l'activité enzymatique en milieu liquide a révélé des activités comprises entre 48 et 67 U/ml, avec une bonne stabilité résiduelle, notamment chez les souches B21, B16 et D13. L'étude de la stabilité de l'enzyme a été approfondie à travers différents stress abiotiques : températures extrêmes (30–80 °C), pH (6–12) et agents chimiques (H₂O₂, SDS, NaCl, EDTA). L'analyse multivariée a permis de distinguer la souche B16 comme la plus robuste, maintenant une activité résiduelle >90 % dans la majorité des conditions testées. L'ajout de certains ions métalliques (Co²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺) a significativement stimulé l'activité amylasique à pH 10, atteignant jusqu'à 72 U/ml avec le cobalt. Enfin, l'extrait enzymatique de la souche B16 a montré des propriétés applicatives intéressantes : effet détergent vis-à-vis des taches amylacées, clarification des jus et amélioration des caractéristiques organoleptiques du pain. Ces résultats confirment le potentiel industriel des amylases alcalines produites, notamment dans les secteurs de la détergence, de l'agroalimentaire et du traitement des déchets amidonnés.

Mots clés : *Bacillus*, amylase alcaline, stabilité enzymatique, pH10, ions métalliques, détergent.

Abstract:

This work is part of the biotechnological valorization of *Bacillus* strains isolated from various Algerian soils, with the objective of producing alkaline amylases stable under harsh physicochemical conditions. Thirty-nine strains ($n = 39$) were screened on starch agar at pH 10, among which six (B16, B21, D13, D7, Ba7, Ba9) exhibited the highest enzymatic index values. Quantitative assays in liquid medium revealed enzyme activities ranging from 48 to 67 U/ml, with good residual stability, particularly in strains B21, B16, and D13. The stability of the enzyme was further investigated under various abiotic stresses, including extreme temperatures (30–80 °C), pH variations (6–12), and chemical agents (H_2O_2 , SDS, NaCl, EDTA). Multivariate analysis identified strain B16 as the most robust, maintaining residual activity above 90% under most of the tested conditions. The addition of specific metal ions (Co^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) significantly enhanced amylase activity at pH 10, reaching up to 72 U/ml in the presence of cobalt. Finally, the enzymatic extract from strain B16 demonstrated promising applications, including detergent activity against starchy stains, juice clarification, and improvement of bread organoleptic properties. These findings confirm the industrial potential of alkaline amylases produced by *Bacillus*, particularly in the detergent, food processing, and starch waste treatment sectors.

Keywords: *Bacillus*, alkaline amylase, enzyme stability, pH 10, metal ions, detergent